Aus dem Veterinärhygienischen und Tierseuchen-Institut
der Universität Gießen.
Direktor: Professor Dr. W. Zwick.

1936

Vergleichende Untersuchungen über die kulturelle Bestimmung der Brucellatypen.

DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

veterinär-medizinischen Fakultät

der

Hessischen Ludwigs-Universität zu Gießen

vorgelegt von

Eberhard Schwarzmaier

approbierter Tierarzt aus Calw (Württ.)

Gießen 1936.

Aus dem Veterinärhygienischen und Tierseuchen-Institut
der Universität Gießen.

Direktor: Professor Dr. W. Zwick.

Vergleichende Untersuchungen über die kulturelle Bestimmung der Brucellatypen.

DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

veterinär-medizinischen Fakultät

der

Hessischen Ludwigs-Universität zu Gießen

vorgelegt von

Eberhard Schwarzmaier

approbierter Tierarzt aus Calw (Württ.)

Gießen 1936.

Druck bei Karl Zeeb, Dornstetten (württ. Schwarzwald).

Gedruckt mit Genehmigung der veterinär-medizinischen Fakultät Gießen.
Referent: Professor Dr. W. Zwick.
Gießen, den 1. Juli 1936.

Inhaltsübersicht.

Einleitung . . . . . Seite 5

Die kulturellen Verfahren zur Typenbestimmung . . . „ 7

Verhalten der Brucellen auf Farbnährböden

1) Schrifttum . . . . . „ 9

2) Eigene Untersuchungen . . . . . „ 10

Schwefelwasserstoffbildung

1) Schrifttum . . . . . „ 15

2) Eigene Untersuchungen . . . . . „ 16

Verhalten der Brucellen auf Eiernährböden

1) Schrifttum . . . . . „ 18

2) Eigene Untersuchungen . . . . . „ 19

Vergleichende Beurteilung der Verfahren . . . . „ 21

Bedeutung der Brucellatypen . . . . . „ 25

Schlußsätze . . . . . „ 27

Schrifttum . . . . . „ 29

Lebenslauf . . . . . „ 31

Anhang (Uebersicht IV und V) . . . . . „ 33

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154009_0368

Einleitung.

1918 hat Alice Evans auf die große Aehnlichkeit, wenn nicht Gleichheit, des Bacterium abortus infectiosi (Bang) mit dem nicht als „Micrococcus", sondern als „Bacterium" anzusprechenden Erreger des Maltafiebers (Bacterium melitense) hingewiesen und die enge Verwandtschaft beider festgestellt. Damit begann eine Zeit reger Forschung über die wechselseitigen Beziehungen dieser Bakterien, denen Meyer und Shaw (1920) den inzwischen üblich gewordenen Artnamen „Brucella" beilegten. Neben der Frage ihrer biologischen Unterscheidbarkeit und ihres Vorkommens wurde namentlich erörtert, ob beide Bakterien wesensgleich sind, ob sie Varietäten einer Art oder getrennte Arten darstellen.

Zeller (1920), dem die Aehnlichkeit der beiden Bakterien schon vor der Veröffentlichung von Evans (1918) aufgefallen war, sprach sich für ihre enge Verwandtschaft aus, ohne sie zunächst morphologisch, kulturell oder serologisch unterscheiden zu können. Evans (1923) sah in ihnen Varietäten einer Art und benannte sie Brucella melitensis var. melitensis und Brucella melitensis var. abortus; auch Brotzu (1927) und Subotnik und Ustupnyi (1931) u. a. hielten sie dafür.

Neben diesen beiden Formen trat mit der Verfeinerung der Unterscheidungsverfahren noch eine dritte, auf das Schwein zurückzuführende, zutage. Während Meyer (1930) die Aufstellung einer eigenen „suis"-Form noch für verfrüht hält und auch andere Forscher (wie Grumbach und Grilicheß [1932], Vignoli und Schafer [1933]) zwei Haupttypen annehmen, treten Huddleson (1929), Zeller (1931), Habs (1932), Klimmer (1932), Zeller und Stockmayer (1932), Mießner und Köser (1933), Manninger (1933), Wilson (1933) und Zeller (1933) für eine Dreiteilung ein. Sie sehen in den drei Formen oder „Typen" unter verschiedenen Umweltsbedingungen zustandegekommene Variationen (Standortsvarietäten, Wirtsanpassungen) der nach Wilson (1933) durch epidemiologische Bedingungen noch stark beeinflußbaren Brucellagruppe. Orlow und Orlowa (1934) vermuten, daß die Ausgangsform der Brucella abortus nahe steht und Brucella melitensis nur eine spätere Entwicklungsstufe darstellt, was etwa der von Favilli (1931) u. a. vertretenen Meinung entsprechen würde, derzufolge Brucella abortus, Brucella melitensis und Brucella paramelitensis (in dieser Reihenfolge) „Positionen ein und desselben Erregers" mit unendlich vielen Zwischenstufen sein sollen.

Herrmann, Korjukin und Spiridonow (1936) lehnen das Bestehen beständiger Typen ab.

Die von den einzelnen Untersuchern gebrauchten Typenbenennungen sind noch nicht einheitlich. Habs (1932) und Zeller (1933) bezeichnen sie in der neuerdings gebräuchlichen und auch im folgenden angewandten Weise als: Brucella abortus (Bang), Brucella suis (Traum) und Brucella melitensis (Bruce).

Diese 3 Typen kennzeichnen biologisch die Erscheinungsformen der Brucellaart, beschränken sich aber in ihrem Vorkommen nicht auf die Tiere, denen sie ihre Namen verdanken.

So kommt Brucella abortus außer bei Rindern, Schafen, Menschen, Pferden und Eseln auch bei Schweinen vor (Meyer und Eddie 1930 u. a.); jedoch haben Cotton (1933) und auch Stockmayer (1933) auf deren geringere Empfänglichkeit für den Rindertyp hingewiesen.

Menschliche Erkrankungen durch Brucella suis sind namentlich in Amerika keine Seltenheit und kommen oftmals auf dem Wege über das Rind zustande (Meyer und Eddie 1930, Kitselman 1932, Beattie und Rice 1934, Harms 1934 und Hayes 1934); auf Schafe wirkt Brucella suis ebenfalls krankmachend (Cotton 1933).

Brucella melitensis wird unter natürlichen Verhältnissen nicht nur bei Ziege, Schaf und Mensch gefunden, sondern vor allem auch beim Rind, das häufig als Vermittler menschlicher Erkrankungen wirkt (Gilles, Pérès und Culty 1932, Lignières 1932, Parisot, Vidal und Robert-Lévy 1932, Taylor und Hazeman 1932, Taylor, Lisbonne und Roman 1932, 1934, Magallon 1934, Taylor, Lisbonne und Vidal 1934 und Benussi 1935).

Schließlich wurden auch Mischinfektionen durch Brucellen zweier Typen beobachtet. Hardy, Jordan, Borts und Hardy (1930) fanden bei einem Patienten nebeneinander Brucella abortus und Brucella suis, desgleichen Jordan und Borts (1931). Zobell und Meyer (1932) berichten über zwei Fälle von Mischinfektion mit Brucella abortus und Brucella melitensis.

In geographischer Hinsicht spielen die einzelnen Typen nicht überall die gleiche Rolle; einmal tritt dieser, einmal jener mehr in den Vordergrund.

Während sich z. B. die menschlichen Erkrankungen in Dänemark, Schweden und Norwegen, in Großbritannien und Deutschland, im Norden, Westen und Zentrum Frankreichs durchweg auf den Rindertyp zurückführen lassen, ist in Amerika neben den anderen namentlich der Schweinetyp und im Süden Frankreichs Brucella melitensis für sie verantwortlich zu machen.

Mit dem buntbewegten Bild, das die Brucellatypen bezüglich ihres Vorkommens bei Mensch und Tier und geographisch bieten, ist die praktische Bedeutung der Typenbestimmung für die Bekämpfung der Brucellosen zur Genüge dargetan. Zwar vermag sie über die unmittelbare Herkunft eines Stammes (ob vom Rind, Menschen, Pferd usf.) keinen Aufschluß zu geben, bietet aber nichtsdestoweniger einen sehr wichtigen Hinweis auf die verantwortliche Seuchenquelle, deren Kenntnis für die Bekämpfung im Einzelfall von ausschlaggebender Bedeutung sein kann.

Was Deutschland anbetrifft, so scheint hier bisher bei Mensch und Tier der Rindertyp (Brucella abortus [Bang]) die maßgebliche Rolle zu spielen; indessen sind Fälle von Schweineaborten durch Brucella suis nicht mehr unbekannt (Mießner und Köser [1935]), so daß eine Beschäftigung mit der Frage der Typenbestimmung, insbesondere nach der technischen Seite hin, durchaus angebracht ist.

Im Rahmen der im hiesigen Institut im Gange befindlichen Untersuchungen über den Erreger des ansteckenden Verkalbens* wurde daher neben einer Reihe von anderen Fragen auch diejenige der kulturellen Typenbestimmung einer Prüfung unterzogen, wobei folgende Gesichtspunkte leitend waren:

1) ob es möglich ist, die einzelnen Brucellastämme einwandfrei in die beschriebenen Typen einzuteilen und welches Verfahren hiezu bei möglichster Einfachheit die größte Zuverlässigkeit bietet;

2) ob die zur Unterscheidung herangezogenen Merkmale und Eigenschaften beständig, wie sie zu werten sind und welche Nutzanwendungen sich aus der Typenfrage ergeben.

Die vergleichend durchgeführten Untersuchungen betrafen im einzelnen: das Verhalten der Brucellen auf farbhaltigen Nährböden, ihr Schwefelwasserstoffbildungsvermögen sowie ihre Kultur auf Eiernährböden.

Die kulturellen Verfahren zur Typenbestimmung.

(Ueber das einschlägige Schrifttum liegen von Habs [1932] und Zeller [1933] ausführliche kritische Zusammenstellungen vor, auf welche bezüglich der älteren Arbeiten verwiesen werden kann. Im folgenden soll in erster Linie das neuere Schrifttum Berücksichtigung finden.)

Um Unterschiede zwischen den einzelnen Brucellatypen zu finden, wurde in erster Linie ihr serologisches und kulturelles Verhalten sowie ihre Tierpathogenität vergleichenden Prüfungen unterzogen.

Untersuchungen über Form, Färbbarkeit, Haltbarkeit, Widerstandsfähigkeit, elektrophoretische Beweglichkeit und anderes mehr haben brauchbare Unterscheidungsmerkmale nicht gezeitigt.

Auch die serologischen Forschungen (Agglutination, Agglutininabsorption; Dissoziation) kamen trotz zweifelsfreier Fortschritte bisher noch nicht zu allgemein anerkannten Ergebnissen.

Hinsichtlich der Pathogenität für Affen, Meerschweinchen und andere Versuchstiere bestehen wohl gewisse Verschiedenheiten, doch reichen sie zur Typenbestimmung nicht aus.

Die besten und brauchbarsten Unterscheidungsmerkmale sind bisher auf kulturellem Gebiete gefunden worden.

Auf gewöhnlichen festen und flüssigen Bakteriennährböden lassen sich Wachstumsunterschiede zwischen Brucella abortus und Brucella melitensis nicht erkennen (Zeller 1920); gegensätzliche Veränderungen im PH-Wert fehlen (v. Wicht 1934). Beobachtungen wie die braune Färbung der Melitensiskulturen (Meyer und Shaw 1920,

*) Das Reichsministerium des Innern hat für diese Forschungsarbeiten in dankenswerter Weise Geldmittel zur Verfügung gestellt.

Kristensen 1931) oder die Häutchenbildung im ölüberschichteten Noguchinährboden durch Brucella melitensis (Brotzu 1921) haben sich nicht als regelmäßig erwiesen. Die Aussaat auf Kulturfiltraten nach *Umberti* (Bonnano 1933) und *Besredka* (Pagnini 1931, 1934, Paltrinieri 1931, 1933) sowie die Kultur in Frauen-, Kuh- und Ziegenmilch (Cantani 1934) brachte ebensowenig verwertbare Ergebnisse wie das Verhalten der Kulturen gegenüber steigenden Dosen von Röntgenstrahlen (Paltrinieri und Paltrinieri 1933).

Olitzki und Bromberg (1931) untersuchten auf synthetischen Nährböden nach dem Verfahren von *Braun, Wolf und Friedlein* den Verwendungsstoffwechsel von Brucella abortus und melitensis, ohne mehr als quantitative Unterschiede zu finden; Pagnini (1933) kam bei seiner Nachprüfung zu negativen Ergebnissen. Dagegen konnten Zobell und Meyer (1931) und Grumbach und Grilicheß (1932) im Nitrat- und Nitrit-Stoffwechsel eine Möglichkeit zur Unterscheidung von Brucella suis einerseits und Brucella abortus und melitensis andererseits erkennen.

Gewisse Verschiedenheiten wurden bei Gegenwart von Pepton hinsichtlich des Glukose-Verbrauches festgestellt insofern, als dieser bei Brucella suis und melitensis deutlich vorhanden ist und bei Brucella abortus nahezu fehlt (McAlpine und Slanetz 1928, Kristensen und Per Holm 1929, Plastridge und McAlpine 1930, Kristensen 1931, Olitzki und Bromberg 1931, Grumbach und Grilicheß 1932). Indessen zeigt dieses Verhalten keine Gesetzmäßigkeit (Di Aichelburg 1935) und wird deshalb als brauchbares Unterscheidungsmerkmal entweder abgelehnt (Mallardo 1930, Confalone 1932, 1933, Grumbach und Grilicheß 1932, Zobell und Meyer 1932, Mießner und Köser 1933, Olin und Lindström 1934, v. Wicht 1934) oder nur als ergänzendes Verfahren empfohlen (Kristensen 1931).

Auch der CO_2-Bedarf von Brucella abortus (Erstkultur aus dem Tierkörper), auf den viele Forscher hinweisen (Buck 1925, McAlpine und Slanetz 1928, Kristensen 1931, Weigmann 1931, Harrdy, Jordan, Borts und Harrdy 1932, v. d. Hoeden 1932, Taylor, Lisbonne und Roman 1932, Zeller und Stockmayer 1932, Smith 1933), ist kein untrügliches Kennzeichen. Einerseits werden nicht allzu selten Rinderstämme beobachtet, die sofort aerob wachsen (Harms 1924, Duncan 1928 [rhodische Rinderstämme]), andererseits können auch andere Stämme, z. B. solche des Schweinetyps, anfänglich CO_2 verlangen (Grumbach und Grilicheß 1932, Mießner und Köser 1933, Harms 1934). Smith (1926) glaubt, daß es sich bei Stämmen mit geringerem CO_2-Anspruch wohl um Impfstämme (vaccinal strains) oder um solche handle, die längere Zeit im Euter lebten. Herrmann, Korjukin und Spiridonow 1936 fanden im CO_2-Anspruch kein typenbeständiges Verhalten.

Thomsen (1933) hat dänische Schweine-, aerob wachsende Rinder- und Melitensisstämme in hohen geradwandigen Flaschen mit 200 g Rindfleisch-Bouillon drei Wochen lang in völliger Ruhe wachsen lassen und beobachten können, daß Brucella suis bei kräftigem ringförmigem Wachstum an der inneren Flaschenwand und deutlichem Oberflächenwachstum einen starken Niederschlag bildete, der sich im Gegensatz zu dem bei Brucella abortus und melitensis entstehenden nur schwer wieder verteilen ließ. Oberflächenwachstum und Ringbildung fehlten bei letzteren zumeist bezw. waren viel schwächer. CO_2-bedingende Rinderstämme wuchsen den Schweinestämmen ähnlich. Damit deckt sich die Thomsensche Beobachtung weitgehend mit der Wachstumsbeschreibung die Zwick und Zeller (1912) für das Abortusbakterium geben.

Eigene Versuche mit der Thomsenschen Flaschenkultur an je zwei Stämmen jeden Typs ließen für Brucella suis ein den Angaben von Thomsen sehr ähnliches Bild beobachten. Bei anfänglich starkem diffusem Wachstum bildete sich ein rasch zunehmender wolkiger Bodensatz. Die Oberfläche des Nährbodens war nach 10 Tagen zu etwa einem Drittel mit einem dünnen grauen Häutchen besetzt, von dem zahlreiche Schlieren bis auf den Flaschenboden herabhingen. Brucella abortus und melitensis zeigten demgegenüber, ohne unter sich wesentliche Unterschiede herauszubilden, bei diffusem Wachstum und feinem, leicht wieder verteilbarem Bodensatz keine oder nur geringe Entwicklung auf der Oberfläche. Die Ringbildung an der inneren Flaschenwand war mäßiger als bei Brucella suis.

Obwohl das Flaschenkulturverfahren nach Thomsen für die Typenunterscheidung, insbesondere zwischen Brucella suis auf der einen und Brucella abortus (aerob wachsende Stämme) und Brucella melitensis auf der anderen Seite, nicht unbrauchbar erschien, wurde von weiteren Versuchen mit diesem Verfahren Abstand genommen. Den in den Mittelpunkt der Untersuchungen gestellten und jetzt im einzelnen näher zu beschreibenden Verfahren gegenüber besitzt es den unbestreitbaren Nachteil, zeitraubend und auch kostspielig zu sein.

Verhalten der Brucellen auf Farbnährböden.

1) Schrifttum.

Einen wesentlichen und grundsätzlichen Fortschritt in der kulturellen Typen-Bestimmung brachten die Arbeiten von Huddleson und Abell (1928) und Huddleson (1929, 1931) mit der Einführung von Farbplatten.

Huddleson und Abell (1928) konnten zunächst feststellen, daß Gentianaviolett, im Verhältnis 1:100000 Leberagar (PH = 6,6) zugesetzt, Brucella suis hemmte, Brucella abortus und Brucella melitensis jedoch ungehindert wachsen ließ. Das gleiche bewirkte — wie die folgende Arbeit von Huddleson (1929) erwies — ein Zusatz von Methylviolett 1:100000 und basischem Fuchsin 1:50000; durch Thionin 1:50000 wurden Brucella suis und Brucella melitensis im Gegensatz zu Brucella abortus nicht behindert. Später fand sich hierzu noch das Pyronin, das in einer Verdünnung von 1:100000 und 1:200000 Brucella abortus nicht, Brucella melitensis kaum oder nicht, Brucella suis aber vollständig hemmte.

1931 prüfte Huddleson sein Verfahren unter Verwendung von Thionin 1:30000 und Pyronin 1:200000 an 656 Stämmen nach und konnte diese ohne Schwierigkeit in die 3 Typen einteilen. Die Brucella abortus-Stämme ließen sich durch basisches Fuchsin 1:25000 nochmals untergruppieren in solche, die den Farbstoff völlig und solche, die ihn nur schwach entfärbten; letztere sprach Huddleson als die vermutlich menschenpathogenen Stämme an. (Habs 1930 und Kien-Hun und Kan 1935 erzielten mit Hilfe der Farbstoffreduktion keine brauchbaren Unterscheidungsmerkmale).

Die Brauchbarkeit des Huddlesonschen Farbplatten-Verfahrens wurde (allein oder zusammen mit anderen Verfahren) in seinen Grundsätzen vielfach nachgeprüft und bestätigt, so von Kristensen und Per Holm (1929), Hardy, Jordan, Borts und Hardy (1930), Meyer und Eddie (1930), Morales-Otero (1930), Plastridge und McAlpine (1930), Kristensen (1931), Weigmann (1931), Wilson (1931), Zeller (1931), Cerruti (1932), Grumbach und Grilicheß (1932), Taylor, Lisbonne und Roman (1932, 1934), Zeller und Stockmayer (1932), Mießner und Köser (1933), Smith (1933), Marchi (1934), Pagnini (1934), Serra (1934) und Taylor, Lisbonne und Vidal (1934).

In den Versuchen von Klimmer (1932) war das Farbverhalten der einzelnen Typen sehr ungleichmäßig und von den Huddlesonschen Angaben zum Teil grundsätzlich abweichend. Auch Hofmann und Bartsch (1933) sind von der Brauchbarkeit der Methylviolett-Thioninprobe nicht überzeugt.

Die zum Teil sehr voneinander abweichenden Ergebnisse in den Nachprüfungen des Verfahrens führen Meyer und Zobell (1932), Zeller (1933) u. a. auf äußere Fehlerquellen zurück (wechselnde Güte des Leberagars, unterschiedliche PH-Werte, verschiedene Farbstoffabrikate, Schwankungen in der verimpften Bakterienmenge sowie in der Bebrütungsdauer).

Grumbach und Grilicheß (1932), Olin und Lindström (1934) und Werschilowa (1934) weisen auf die Wichtigkeit der Beachtung des Dissoziationszustandes hin; Werschilowa ist aber mit Grumbach und Grilicheß der Auffassung, daß das Farbenverfahren am wenigsten von ihm beeinflußt wird. Marshall und Jared (1931) finden im Gegensatz zu Mallman und Gallo (1933) zwischen S- und R-Stämmen keine nennenswerten Unterschiede im Farbverhalten.

Meyer und Zobell (1932) konnten auf halbflüssigem Rindfleischagar mit Zusätzen von Fuchsin 1 : 50000, Thionin 1 : 50000 und Pyronin 1 : 200000 444 Stämme zu 98 % ohne weiteres gruppieren. Orlow und Orlowa (1934) befürworten dieses abgeänderte Verfahren, weil es mit dem funktionellen Charakter der Stämme am besten übereinstimme. Makkaveiskij und Karkadinovskaja (1932) hatten mit Gentianaviolett, Methylviolett und Thionin als Zusätzen zu festen und flüssigen Nährböden keinen Erfolg.

2) Eigene Untersuchungen.

Den Huddlesonschen Angaben folgend wurden von den meisten Untersuchern Rinderleberagar-Platten verwendet. Da sich aber im hiesigen Institut seit Jahren ein gewöhnlicher Agarnährboden in der Praxis der Bangbakterienzüchtung bestens bewährt hat, so wurde dieser in wiederholten Versuchen an einer Reihe von Stämmen mit dem Huddlesonschen Leberagar auf seine Brauchbarkeit für das Thionin-Pyronin-Verfahren (und den H_2S-Nachweis) verglichen. Gleichzeitig wurde geprüft, ob bei Verwendung von schräg erstarrtem Agar die gleichen Ergebnisse zu erzielen sind wie mit Platten.

Die Bebrütung der Kulturen erfolgte nebeneinander aerob und in Kohlensäureatmosphäre.

Zwischen beiden Nährböden ergaben sich sowohl auf den Platten-, wie in den Röhrchenkulturen nur geringgradige Wachstumsunterschiede, auch stimmte das Farbverhalten überein.

Für die weiteren Versuche wurde nunmehr als Nährboden der Institutsagar und als Kulturform anstelle der Platte das Röhrchen gewählt; letzteres, weil bei ihm die Gefahr der Verunreinigung auch bei wiederholter Besichtigung so gut wie ausgeschlossen war.

Der Institutsagar hat folgende Zusammensetzung: Pferdefleischwasser, 2% Agar, 1%, Pepton Witte, 0,3%, Kochsalz, 0,2%, sekundäres Natriumphosphat und ist auf PH=7,6 eingestellt.

Pferdefleischwasser als Agargrundlage erwies sich in besonderen Vergleichsversuchen für das Wachstum der Brucellen förderlicher als Rindfleischwasser; das Wachstum trat rascher ein und war üppiger. Auch für den Schwefelwasserstoffnachweis eignete sich der Pferdefleischwasseragar besser.

Um für die sich über viele Monate erstreckenden Versuche störende Schwankungen in der Güte des Grundnährbodens möglichst auszuschalten, wurde das für die Herstellung des Agars erforderliche Pferdefleischwasser in großer Menge hergerichtet und unter entsprechendem Verschluß aufbewahrt.

An Farbstoffen fanden Thionin und Pyronin Verwendung. Da jedoch bekannt war (Zeller und Stockmayer 1932 u. a.), daß nicht alle Fabrikate die gleichen typentrennenden Eigenschaften besitzen wie die von Huddleson benutzten der National Aniline und Chemical Co., Inc., New York, N. Y., wurden mehrere Fabrikate nebeneinander in den Versuch genommen, um festzustellen, ob deutsche Fabrikate eine zuverlässige Typentrennung gestatten oder nicht.

Verwendung fanden:

1) Thionin und Pyronin der I. G. Farbenindustrie AG., Höchst a M.,
2) Thionin Ehrlich (Lauths Violett) und Pyronin G der Fa. E. Merck, Darmstadt, sowie
3) Thionin (Ehrlich-Hoyer), Schultz Nr. 348, 2nd Ed. und Pyronin, Schultz Nr. 469, 4th Ed. der National Aniline and Chemical Co., Inc., New York, N. Y.

Die verschiedenen Fabrikate von Pyronin zeigten leichte Wasserlöslichkeit. Bei Thionin ergaben sich in dieser Beziehung jedoch Schwierigkeiten, auf die schon Kristensen (1931) aufmerksam gemacht hat. Die Thioninlösungen mußten daher vor dem Zusatz zu den Nährböden besonders gut durchgeschüttelt werden. Störungen durch einzelne ungelöst in den Nährboden gelangte Farbstoffteilchen traten nicht in Erscheinung; auch waren die auf diese Weise zustandegekommenen geringen Ungenauigkeiten in der zahlenmäßigen Verdünnung für den Erfolg ohne Belang.

Die Farbzusätze erfolgten aus einer jeweils frisch angesetzten 1%igen Lösung und in geometrischen Verdünnungen: Thionin 1:2500 bis 1:80000, Pyronin 1:6250 bis 1:200000. Jeder Stamm wurde in 4 fortlaufenden Farbverdünnungen

untersucht, wobei die erste Thioninverdünnung von Fall zu Fall zwischen 1 : 2500 und 1 : 10000, die erste Pyroninverdünnung zwischen 1 : 6250 und 1 : 25000 lag.

Zur Untersuchung kamen 105 Brucellastämme, über deren Herkunft die Uebersicht I Aufschluß gibt.*

Sämtliche Stämme wurden gleichzeitig auf ihr H_2S-Bildungsvermögen geprüft (siehe S. 15).

Für die Beimpfung der jedesmal frisch hergestellten Nährböden wurden gut gewachsene Schrägagarkulturen (48 h) mit je 3 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und im Ausstrich auf Reinheit geprüft; spontanagglutinierende Stämme befanden sich unter den untersuchten keine. Jedes Röhrchen wurde mit je einer Oese (2 mm innerer Weite) der genannten Bakterienaufschwemmungen beimpft. Ferner wurde jede Versuchsreihe doppelt angelegt und je einmal aerob und in Kohlensäureatmosphäre (10 % ig) bebrütet.

Uebersicht I.

Herkunft	Brucella abortus		Brucella suis		Brucella melitensis
	Rind	Mensch	Schwein	Mensch	
Amerika	—	2	4	3	—
Dänemark	—	34	1	—	(4 ital.)
Institut	17	—	—	—	(2 ital.)
Italien	—	—	—	—	4 (10)
R. G. A.	—	3	3	3	3
Schweden	—	1	—	—	—
Schweiz	3	—	4	—	—
Ungarn	2	—	7	—	5
	22	40	19	6	18

Die Herstellung der erforderlichen CO_2-Spannung erfolgte in bewährter Weise mit Natriumbikarbonat und n 10 Schwefelsäure (2 ccm je Liter Gefäßraum). Das von Lübke (1933) angegebene Verfahren der Alkoholverbrennung hat sich zwar als ebenbürtig und sehr sauber erwiesen, fand aber wegen der mit der Hitzeentwicklung verbundenen Sprunggefahr für die benutzten Glasgefäße keine weitere Anwendung.

Die Ablesung der Kulturen wurde regelmäßig am 2., 4., 7. und 10. Tag nach der Beimpfung vorgenommen.

Die Auswertung der im einzelnen erzielten Ergebnisse hatte in zweierlei Hinsicht zu geschehen: einmal für die beiden Farbstoffe gleicher fabrikatorischer Herkunft und dann für die Farbfabrikate untereinander.

*) Für die Ueberlassung der Stämme ist das Institut dem Reichsgesundheitsamt-Berlin sowie den Herren Dr. Favilli-Florenz, Prof. Dr. Frei-Zürich, Dr. Huddleson-East Lansing, Dr. Kristensen-Kopenhagen und Prof. Dr. Manninger-Budapest zu Dank verpflichtet.

In der im Anhang befindlichen Uebersicht IV ist der Versuch gemacht, die an über 5000 Einzelkulturen gewonnenen Ergebnisse kurz zusammengefaßt wiederzugeben. Einzelne Stämme, die bemerkenswerte Unregelmäßigkeiten zeigten, sind in der Uebersicht V noch einmal für sich aufgeführt (ungarische Schweinestämme).

Da die Mehrzahl der Stämme bereits vor längerer Zeit gezüchtet und inzwischen an aerobe Bedingungen gewöhnt war, konnte der CO_2-Bedarf als Unterscheidungsmerkmal der Brucella abortus gegenüber den zumeist sofort aerob wachsenden Brucella suis und Brucella melitensis nicht allgemein herangezogen werden. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, wuchsen alle untersuchten Stämme unter aeroben Bedingungen. 8 von 34 menschlichen Abortusstämmen aus Dänemark, 1 von 3 schweizerischen und 6 von 17 hier im Institut gezüchteten Rinderstämmen verlangten CO_2. Damit war für sie ein, wenn auch nicht unbedingt sicheres, so doch als Ergänzung zu den übrigen Befunden wertvolles Kennzeichen ihrer Zugehörigkeit zum Typus der Brucella abortus gewonnen.

In der Regel gewöhnt sich Brucella abortus sehr rasch an aerobes Wachstum, jedoch sind Ausnahmen davon nicht allzu selten (Kristensen und Per Holm 1929, Grumbach und Grilicheß 1933). Einzelne der oben genannten Stämme haben ihren CO_2-Anspruch über viele Nährbodenpassagen hin beibehalten. Auf der anderen Seite werden aber auch Rinderstämme beobachtet, die schon bei der Züchtung aus dem Tierkörper aerob wachsen (Harms 1924, Smith 1926, Duncan 1928 u. a.; eigene Beobachtungen) und, was besonders hervorgehoben sei, Schweinestämme, die anfänglich nur in CO_2 zur Entwicklung kommen (Grumbach und Grilicheß 1932, Mießner und Köser 1933, Harms 1934). Für sich allein reicht also das Verhalten in erhöhter Kohlensäurespannung zur Typenbestimmung nicht aus. Erwähnt sei noch, daß bei den untersuchten Brucella suis- und Brucella melitensis-Stämmen die Bebrütung in der Kohlensäureatmosphäre der aeroben gegenüber nicht von Nachteil war, im Gegenteil häufig noch zu fördern schien. Erst höhere CO_2-Konzentrationen von 40 % und mehr bewirkten (in Uebereinstimmung mit Wilson 1933) eine starke Hemmung, die gleichzeitig aber auch Brucella abortus betraf.

Bezüglich des Farbverhaltens haben die Versuche zunächst ganz allgemein gezeigt, daß feste Wachstums- bzw. Hemmungsgrenzen nirgends bestehen. Wie Kristensen (1931), Klimmer (1932), Zeller und Stockmayer (1932), Mießner und Köser (1933) u. a. bereits hervorgehoben haben, liegen vielmehr fließende Uebergänge vor, die ihren Ausdruck darin finden, daß die einzelnen Typen für den einen

oder anderen Farbstoff grundsätzlich verschieden empfindlich sind.

Thionin der I. G. Farbenindustrie AG. hemmte Brucella abortus stark; Brucella suis und Brucella melitensis wurden etwa in gleicher Weise nicht oder nur mäßig behindert. *Pyronin* dieser Herkunft bot allen drei Typen ziemlich gleich gute Wachstumsmöglichkeiten; nur einige ungarische Schweinestämme wurden etwas stärker von ihm beeinflußt.

Das von der Firma Merck-Darmstadt hergestellte *Thionin* hemmte Brucella abortus besonders stark; gleichzeitig kamen aber auch Brucella suis und Brucella melitensis bei diesem Farbstoff schlechter zur Entwicklung. Auf *Pyronin* gediehen die drei Typen etwa gleich gut.

Von den amerikanischen Farben vertrug Brucella abortus *Pyronin* sehr gut, *Thionin* dagegen nicht oder nur in sehr starker Verdünnung; für Brucella suis lagen die Verhältnisse genau umgekehrt, während Brucella melitensis von beiden Farbstoffen in etwa gleichem Grade mäßig gehemmt wurde.

Untereinander verglichen, lassen sich die geprüften Fabrikate der beiden Farbstoffe, ohne dabei der Beurteilung der untersuchten Stämme im einzelnen vorzugreifen, etwa wie folgt bewerten:

1) Brauchbare Unterschiede im Verhalten von Brucella abortus, Brucella suis und Brucella melitensis traten nur bei Verwendung der amerikanischen Farbstoffe zutage.

2) Die beiden deutschen Farbfabrikate vermochten zwar Brucella abortus zu kennzeichnen, versagten aber in der Unterscheidung zwischen Brucella suis und Brucella melitensis. Den Farbstoffen der Firma Merck-Darmstadt kam allgemein eine stärkere Hemmwirkung zu, als denen der I. G. Farbenindustrie AG.

Im großen und ganzen waren die auf den Farbnährböden zu beobachtenden grundsätzlichen Wachstumsgrenzen bereits nach zweitägiger Bebrütung angedeutet; sie wurden bis zum 4. Tage mit zunehmendem Wachstum noch sinnfälliger, hielten sich aber in den vorgezeichneten Grenzen. Erst vom 7., (in der Regel vom 10.), Tage ab verbreiterte sich bei einzelnen Stämmen die Wachstumszone etwas. Die Wachstumsstärke gab in diesen Fällen jedoch immer noch einen Anhaltspunkt für die bestehende hemmende Wirkung.

Der richtige Zeitpunkt für die Beurteilung der Kulturen dürfte, kräftiges Wachstum der unbedingt beizugebenden Vergleichskultur (ohne Farbzusatz) vorausgesetzt, zwischen dem 4. und 7. Tage liegen. Der im Anhang befindlichen Uebersicht IV und V ist diese Beurteilungsweise zugrundegelegt;

Spätwachstum nach dem 7. Tage fand nur bedingte Berücksichtigung.

Auf die weiteren Beobachtungen wird im einzelnen unten bei der vergleichenden Beurteilung der geprüften Verfahren näher eingegangen werden.

Schwefelwasserstoffbildung.

1) Schrifttum.

Brucella abortus bildet nach den Beobachtungen von Zwick und Zeller (1913) Schwefelwasserstoff. Huddleson und seine Mitarbeiter Hasley, Torrey und Abell (1927—29) konnten dies in Versuchen auf Leberagar nicht nur bestätigen, sondern fanden darüber hinaus, daß auch Brucella suis H_2S erzeugt, gradmäßig sogar noch stärker als Brucella abortus, während Brucella melitensis dies nicht oder nur in Spuren zu tun vermag.

Zahlreiche Nachuntersucher haben dies grundsätzlich anerkannt: Favilli (1930, 1931), Kristensen (1931), Olitzki und Bromberg (1931), Wilson (1931), Zeller (1931), Cerruti (1932), Makkaveiskij und Karkadinovskaja (1932), Pugnani (1932), Taylor, Lisbonne und Roman (1932), Zeller und Stockmayer (1932), Famulari und Pisa (1933), Mießner und Köser (1933), Smith (1933), Wilson (1933), Costantino (1934), Fernández Ithurrat (1934), Menzani (1934), Serra (1934) und Di Mino (1935).

Von anderer Seite wurde die unterschiedliche Schwefelwasserstoffbildung zwar auch anerkannt, ihrer Schwankungen und Unregelmäßigkeiten wegen aber als unzuverlässig oder minder bedeutend bezeichnet und, mindestens als alleiniges Unterscheidungsmerkmal, abgelehnt (Paltrinieri 1931, Grumbach und Grilicheß 1932, Zobell und Meyer 1932, Marchi 1934, Orlow und Orlowa 1934, Lipatoff 1935).

Hofmann und Bartsch (1933) fanden das H_2S-Verfahren zur Unterscheidung zwischen Brucella abortus und Brucella melitensis brauchbar, sofern es sich um frisch gezüchtete Stämme handelt; mit dem Altern traten gewisse Abwandlungen ein. Auch Pagnini (1934) beobachtete bei älteren Rinderstämmen geringere Schwefelwasserstoffbildung. Da gerade Rinderstämme häufig Ausnahmen bilden (Taylor, Lisbonne und Roman 1932, Zeller und Stockmayer 1932), ist es durchaus berechtigt, wenn Wilson (1933) beim Fehlen von H_2S zur Vorsicht in den Schlüssen rät.

Mallmann und Gallo (1933), Olin und Lindström (1934) und Werschilowa (1934) machen auf die Wichtigkeit der Berücksichtigung des Dissoziationszustandes aufmerksam. Wiederholte Serisierung vermag den Angaben von Favilli (1931) zufolge trotz der sonstigen biologischen Wandlungen das H_2S-Bildungsvermögen nicht zu verändern. Durch Tierpassagen (Meerschweinchen, weiße Mäuse) soll nach Herrmann, Korjukin und Spiridonow (1936) die H_2S-Bildung so stark beeinflußt werden, daß sie als brauchbares Unterscheidungsmerkmal nicht in Betracht kommen kann.

Von den meisten Verfassern wird die Schwefelwasserstoffbildung als ergänzendes Verfahren zum Farbverhalten empfohlen und angewandt.

Als Nährboden steht im Vordergrund der Rinderleberschrägagar; Cerrutti (1932) sah, je nachdem der Agar aus Rinder-, Schweine-, Ziegen-, Pferde- oder Schafleber hergestellt wurde, starke Schwankungen in der H_2S-Bildung; am geeignetsten erschienen ihm Ziegen- und Schafleberagar, doch benutzte er hauptsächlich solchen aus Rinderleber. Zeller und Stockmayer (1932) fanden 2% igen Glyzerinagar verläßlicher; Hofmann und Bartsch (1933) zogen neben dem Huddlesonschen Nährboden 4% igen Glyzerinagar heran, während Di Mino (1935) mit gewöhnlichem und Traubenzuckeragar gleich gute Ergebnisse erzielte wie mit Stafseth-Nährböden. Die Wahl des Nährbodens ist im übrigen für die Typentrennung insofern nicht gleichgültig, als je nach der Zusammensetzung desselben (z. B. bei Cystinzusatz) auch Brucella melitensis Schwefelwasserstoff zu bilden vermag (Kristensen 1931, Olitzki und Bromberg 1931, Zobell und Meyer 1931, Makkaveiskij und Karkadinovskaja 1932, Cerruti 1932). Der H_2S-Nachweis wird allgemein mit Hilfe von Bleiazetatstreifen geführt. Zobell und Faltham (1934) setzten den Nährböden als „Detektor" für die bakterielle Schwefelwasserstoffbildung Eisen, Wismuth oder Blei zu und empfehlen Ferriammoniumzitrat (0,05%) oder Ferroacetat (0,03%), wobei die Nährböden mindestens 3,0% Pepton enthalten müssen; für unbekannte Reinkulturen ziehen sie jedoch ebenfalls Bleiacetatstreifen vor, weil diese eine ziemlich genaue Schätzung der H_2S-Bildung gestatten.

2) Eigene Untersuchungen.

Als Nährboden erwies sich in den Voruntersuchungen (s. Seite 11) der vorhandene Institutsagar als gut brauchbar; namentlich waren bei ihm die Unterschiede zwischen Brucella abortus und Brucella melitensis deutlich ausgeprägt. Ein Zusatz von Glyzerin (2—4%) war nicht unbedingt nötig, wurde aber jeweils als Kontrolle mitangewandt.

Zum Nachweis des Schwefelwasserstoffes wurden Bleiacetatstreifen benutzt.

Die Herstellung derselben ging in der Weise vor sich, daß 10 mm breite, etwa 12 cm lange Streifen feinkörnigen Fließpapiers gleichmäßig gebündelt für 10 Minuten in 10%ige Bleiacetatlösung eingetaucht wurden. Nachdem man sie über Nacht hatte abtropfen lassen, wurden sie an einem Korkstopfen befestigt, in eine Flasche von entsprechender Größe eingehängt und hierin ¾ Stunden im Dampftopf sterilisiert. Die so gewonnenen Streifen bewahrten, sofern die Flaschen nicht unnötig offen standen, ihre Feuchtigkeit und waren selbst monatelang brauchbar.

Wie für die Prüfung des Farbverhaltens, so wurden auch zum Nachweis der Schwefelwasserstoffbildung 2 Kulturreihen nebeneinander angelegt und je eine aerob bezw. in CO_2-Atmosphäre bebrütet; nach Kristensen (1931) und Hofmann und Bartsch (1933) sollten dabei keine Unterschiede entstehen. Zobell und Meyer (1930) und Mießner und Köser (1933) fanden dagegen in CO_2 stärkere Reaktionen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen in unseren Versuchen: Die Schwefelwasserstoffbildung war in allen in Kohlensäure bebrüteten Kulturen stärker. Insbesondere zeigten Stämme, die unter aeroben Verhältnissen H_2S nicht gebildet haben

(Brucella melitensis), deutliche Spuren von solchem; aerob angedeutete Reaktionen wurden unter dem Einfluß der Kohlensäureatmosphäre sinnfälliger. Insgesamt handelte es sich jedoch nur um gradmäßige Unterschiede, die für die Typenbestimmung selbst ohne wesentliche Bedeutung waren.

Zur Prüfung der Schwefelwasserstoffbildung, die neben der Untersuchung auf das Farbverhalten einherging, wurden jedesmal beim Ablesen der Kulturen, d. h. also am 2., 4. und 7. Tag, die eingehängten Streifen erneuert. Die herausgenommenen Streifen ergaben, einige Minuten in Natriumthiosulfat (5"„ig) fixiert, dann gewässert, getrocknet und nebeneinander aufgeklebt, ein eindrucksvolles Bild des Schwefelwasserstoffverhaltens eines Stammes.

Unter Hinweis auf die im Anhang befindliche Zusammenstellung (Uebersicht IV) ist zusammenfassend zu sagen: daß Brucella abortus und Brucella suis in der Regel H_2S deutlich bildeten, daß aber die H_2S-Bildung der letzteren diejenige von Brucella abortus zumeist nicht übertraf. Die von Huddleson in dieser Hinsicht gemachten und mit zur Typenunterscheidung herangezogenen Angaben konnten auch von Favilli (1931) nicht voll bestätigt werden. War somit zwischen Brucella abortus und Brucella suis eine zuverlässige Unterscheidung auf Grund der Schwefelwasserstoffbildung nicht möglich, so doch bis zu einem gewissen Grade zwischen den genannten und Brucella melitensis. Die geprüften Brucella melitensis-Stämme vermochten unter den hiefür ausschlaggebenden aeroben Verhältnissen H_2S entweder nicht oder nur in Spuren zu erzeugen.

Für sich allein gesehen, besitzt die Schwefelwasserstoffbildung als Typenkennzeichen demnach nur beschränkten Wert, da sie sinnfällige Unterschiede nur zwischen Brucella abortus und Brucella suis auf der einen, und Brucella melitensis auf der anderen Seite zutage fördert, wobei aber gleich zu betonen ist, daß bei allen Typen Stämme mit abweichendem Verhalten vorkommen. Hierauf wird weiter unten bei der vergleichsweisen Betrachtung der Verfahren noch näher einzugehen sein.

Um möglichste Sicherheit in der Beurteilung zu gewinnen, wurde im Zusammenhang mit den Versuchen zur Typenbestimmung die Abhängigkeit des Schwefelwasserstoffnachweises von einigen äußeren Umständen, wie der Größe der Kulturoberfläche, der Breite der verwendeten Bleiacetatstreifen, der Art und Weise ihrer Einhängung in das Kulturröhrchen und ihrer Feuchtigkeit näher untersucht. Zu den entsprechenden Versuchen fanden Stämme aller drei Typen und als Nährboden der Institutsagar Verwendung.

Zwischen der Größe der Nährbodenoberfläche (quer, steil und flach erstarrter, auf der ganzen Oberfläche oder nur in Zickzacklinien beimpfter Agar) und dem Umfang der Schwärzung der eingehängten, in ihren Ausmaßen vollkommen gleichen Bleiacetatstreifen zeigten sich keine bemerkenswerten Unterschiede und Beziehungen.

Bei Verwendung von Streifen geringerer Breite reichte die Schwärzung entsprechend höher hinauf. Diesem, der Beurteilung zweifellos dienlichen Vorzug steht aber der Nachteil gegenüber, daß schmälere Streifen weniger glatt hängen und sowohl in der Herstellung als auch in der Verwendung schwieriger zu handhaben sind.

Ob die Streifen gleichlaufend mit der Nährbodenoberfläche oder senkrecht zu ihr eingehängt wurden, war ebensowenig von Bedeutung, wie der Umstand, ob sie feucht oder trocken waren.

Um allen Zufälligkeiten aus dem Wege zu gehen, wurden in unseren Versuchen die Bleiacetatstreifen jeweils so in die Röhrchen eingehängt, daß sich der untere Rand des Streifens mit dem oberen Rande des Nährmittels auf gleicher Höhe befand.

Als regelmäßige Beobachtung ist noch zu vermerken: daß in allen Kulturröhrchen, die einen Bleiacetatstreifen enthielten und in Kohlensäureatmosphäre bebrütet wurden, das Bakterienwachstum im oberen Abschnitt des Nährbodens und zwar etwa 2 cm vom oberen Rand entfernt plötzlich wie waagrecht abgeschnitten aufhörte. In den aerob bebrüteten Kontrollen sowie in Röhrchen ohne Bleiacetatstreifen (CO_2) reichte der entstehende Kulturrasen bis zum oberen Nährbodenrand. Der Grund für die auffallende Erscheinung dürfte, wie der Zusatz von Lakmus zum Nährboden erwies, in einer starken Säuerung des oberen Nährbodenabschnittes zu suchen sein (Freiwerden von Essigsäure?)

Bei Entfernung der Kohlensäure und weiterer Bebrütung unter aeroben Verhältnissen trat bis zu einem gewissen Grade nachträgliches Wachstum ein; im großen und ganzen schienen jedoch die eingesäten Bakterien in dem betreffenden Abschnitt abgetötet zu sein. Eine ganz ähnliche Wachstumserscheinung war übrigens auch bei aeroben Kulturen (ohne Bleiacetatstreifen), die nach allzustarkem Abglühen des Röhrchens den beim Verkohlen des Wattestopfens entstehenden Verbrennungsgasen ausgesetzt waren, zu beobachten.

Verhalten der Brucellen auf Eiernährböden.

1) Schrifttum.

Eiernährböden wurden erstmals von De Santis (1933) zur Unterscheidung zwischen Brucella abortus und Brucella melitensis herangezogen.

De Santis (1933) fand, daß auf den von *Petragnani* und *Petroff* für die Tuberkelbakterienzüchtung angegebenen Eiernährböden Brucella abortus im Gegensatz zu Brucella melitensis nicht zu wachsen vermag. Die hemmende Wirkung übte das Eiweiß aus. Ob die Nährböden den vorgeschriebenen Malachitgrün- bzw. Gentianaviolettzusatz besaßen oder

nicht, war ohne Einfluß. Brucella melitensis verwandelte die hellgrüne Farbe des Petragnani-Nährbodens allmählich in dunkelgrün.

Marchi (1934), Serra (1934), Tosatti (1934), Margani (1935), Martini (1935), Di Mino (1935), Pagnini (1935) und Vittone (1935) haben das Verfahren, von einigen Abweichungen abgesehen, grundsätzlich bestätigen können. Liddo (1933), Foresti (1934) und Menzani (1934) erzielten weniger günstige Ergebnisse. Im übrigen wurde die gute Uebereinstimmung der auf Eiernährböden erhobenen Befunde mit den durch das Farbverfahren und den Nachweis der Schwefelwasserstoffbildung gewonnenen hervorgehoben (Serra 1934); Di Mino (1935) bezeichnet die Kultur auf Eiernährböden als bestes Verfahren, während Pagnini (1935) und Vittone (1935) die Hudlesonschen Verfahren etwas überlegen finden.

In eigenen Versuchen (Schwarzmaier 1936), zu denen der Originalnährboden nach *Petragnani* ohne Glyzerin und eine von Witte (1935) für die Tuberkelbakterienzüchtung angegebene hämatinhaltige Abänderung dieses Nährbodens* benutzt wurde, konnten die De Santisschen Beobachtungen an 70 Stämmen verschiedener Herkunft bestätigt werden. Dabei ergab sich weiterhin, daß bei gleichzeitiger Verwendung der genannten Nährböden mit und ohne Malachitgrünzusatz auch Brucella suis ein für die Typentrennung brauchbares Verhalten zeigte, indem sie auf den farblosen Nährböden ungehindert und üppig wuchs, auf den farbhaltigen dagegen vollkommen gehemmt wurde. Erst bei längerer Bebrütungszeit, meist aber nicht vor dem 9. oder 10. Tage, trat bei einzelnen ursprünglich völlig gehemmten Schweine- und Rinderstämmen Spätwachstum auf, das aber als solches leicht zu erkennen war, weil es sich nur in Gestalt weniger Einzelkolonien ausprägte; der Typenunterscheidung wurde also durch das Spätwachstum kein Abbruch getan. Durch Erhöhung des Malachitgrünzusatzes auf die doppelte oder dreifache Menge ließen sich auch die spätwachsenden Stämme vollständig hemmen, ohne daß hierbei Störungen in der Entwicklung von Brucella melitensis eintraten.

Einen einfacher herzustellenden und ebenfalls auf der hemmenden Wirkung des Eiweiß aufgebauten Nährboden (4 Teile Agar, 1 Teil Milch + Ei $\overline{aa}$), auf dem Brucella melitensis gut, Brucella abortus aber nicht oder nur schwach wachsen soll, hat Bruschettini (1934, 1935) empfohlen.

2) Eigene Untersuchungen.

Ein Teil der auf ihr Farbverhalten und ihr H_2S-Bildungsvermögen untersuchten Stämme wurde auch hinsichtlich seines Verhaltens auf Eiernährböden einer Prüfung unterzogen. Die unter Verwendung des Originalnährbodens nach *Petragnani* und der hämatinhaltigen Abänderung *Petragnani-Witte* erzielten Ergebnisse sind in der Uebersicht IV (Anhang) zusammengefaßt berücksichtigt. Einzelheiten wurden an anderer Stelle (Schwarzmaier 1936) bereits mitgeteilt.

Grundsätzlich zeigte es sich, daß Brucella melitensis auf den Nährböden mit und ohne Malachitgrünzusatz** rasch und in üppigem Rasen zur Entwicklung kam und Brucella abortus

*) $^1/_2$ Milch, $^1/_2$ natursaure Bouillon, 1,5 % Hämatin; sonst Originalvorschrift von Petragnani (mit Glyzerin).

**) Malachitgrün, standardisierter Farbstoff „Bayer-Meister-Lucius".

vollständig gehemmt wurde. Eine Zwischenstellung nahm Brucella suis ein, die bei üppigem Wachstum auf den farblosen Nährböden, auf den malachitgrünhaltigen mindestens während der für die Typenbestimmung wichtigen ersten 4 bis 7 Tage vollständig gehemmt wurde, und erst nach diesem Zeitpunkt in einzelnen Fällen zur Entwicklung kam. Zu Verwechslungen führte das Spätwachstum nicht, denn Rasenbildung, wie sie bei Brucella melitensis regelmäßig ist, trat nie in Erscheinung; zur Entwicklung kamen lediglich ganz vereinzelte, meist nur 1 oder 2 Kolonien. Der hämatin- und glyzerinhaltige Nährboden *Petragnani-Witte* zeigte sich durch seine stärkere hemmende Wirkung dem Original-Petragnani etwas überlegen.

In neuen Versuchen wurde der Milch-Ei-Agar nach *Bruschettini* an insgesamt je 7 Stämmen jeden Typs auf seine Eignung für die Brucellenunterscheidung geprüft.

Da Bruschettini (1934), wie De Santis (1933), Wachstumsunterschiede nur bezüglich Brucella abortus und Brucella melitensis angegeben hat, wurde im Hinblick auf Brucella suis

Uebersicht II.

	Agar + (Milch + Ganzei)				Agar + (Milch + Eiweiß)			
	ohne Farbe	25000 Malachitgrün	40000 Malachitgrün	100000 Malachitgrün	ohne Farbe	25000 Malachitgrün	40000 Malachitgrün	100000 Malachitgrün
Br. abortus	—	—	—	—	—	—	—	—
Br. suis	++	—	—	—	—(+)	—	—	—
Br. melitensis	+	—(+)	+	+	+	—	—	+

noch ein entsprechender Nährboden, unter Weglassung des Eigelbs, nur mit Milch + Eiweiß $\frac{a}{aa}$ hergestellt und beiden Nährböden Farbe zugesetzt.

Die mit diesen Nährböden erzielten Ergebnisse stimmten untereinander überein und sind in der Uebersicht II zusammengefaßt wiedergegeben.

Ganz allgemein gesehen, blieb das Wachstum auf dem Nährboden nach Bruschettini hinter dem auf den vorhergenannten Eiernährböden zurück. Nichtsdestoweniger war es aber möglich, einmal durch die gleichzeitige Verwendung von Nährböden mit Ganzei bzw. nur mit Eiweißzusatz und zum anderen durch Zusatz von Malachitgrün in Verdünnungen von 1 : 25000 bis 1 : 40000 zwischen allen drei Typen Wachstumsunterschiede festzustellen. Brucella abortus und Brucella melitensis verhielten sich auf beiden Nährböden übereinstimmend und den Angaben von Bruschettini entsprechend;

Brucella abortus wurde völlig gehemmt, Brucella melitensis wuchs gut. Brucella suis fand nur auf dem das ganze Ei enthaltenden Nährboden die erforderlichen Wachstumsbedingungen; auf dem mit Eiweiß allein hergestellten wurde sie völlig gehemmt. 3 Stämme zeigten um den 7. bis 10. Tag Spätwachstum.

Der Zusatz von Thionin, Pyronin, Methylviolett und Gentianaviolett (1 : 25000, 1 : 100000) war für die Typentrennung wertlos. Nur durch Malachitgrün (1 : 25000 bis 1 : 40000) konnte auf dem ganzeihaltigen Nährboden eine Hemmung von Brucella suis herbeigeführt werden. Damit entsprach das Typenverhalten dem auf den Petragnaninährböden beobachteten. Indessen hemmte Malachitgrün auch einzelne Melitensisstämme, so daß die Sicherheit in der Typenbestimmung geringer war als auf den vorgenannten.

Ein weiterer Ausbau des Verfahrens durch allgemein wachstumsfördernde Zusätze und Verwendung anderer Farbstoffe ist vielleicht nicht aussichtslos und wegen der verhältnismäßig einfachen Herstellung der Nährböden auch nicht unzweckmäßig. Von einer Fortsetzung der Untersuchungen wurde jedoch zunächst Abstand genommen.

Vergleichende Beurteilung der Verfahren.

Zum Vergleich der im einzelnen geprüften Verfahren wurden die untersuchten Stämme nach ihrer geographischen Herkunft und innerhalb dieser nach den Wirten geordnet, aus denen sie den Vorberichten zufolge gezüchtet worden sind. Demgemäß ist die Uebersicht IV (im Anhang) aufgebaut.

Die in Amerika bei Schweinen und Menschen gefundenen (4 bzw. 3) Stämme vom Typ der Brucella suis erwiesen sich in allen drei Verfahren als Stämme dieses Typs. Sie bildeten kräftig Schwefelwasserstoff, wuchsen nur auf Eiernährböden ohne Malachitgrünzusatz und wurden bei guter Entwicklung auf Thionin von Pyronin amerikanischer Herkunft gehemmt. Mit den deutschen Farbstoffen waren sie nicht zu bestimmen; Pyronin der I. G. Farbenindustrie AG. wirkte auf die 3 von Menschen und auf 2 von Schweinen gewonnene Stämme etwas hemmend. Die beiden Brucella abortus-Stämme menschlicher Abstammung gehörten übereinstimmend diesem Typ an, der auch bei Verwendung der deutschen Farbstoffe zum Ausdruck kam. Ihr H_2S-Bildungsvermögen war etwas geringer als dasjenige der Stämme des Schweinetyps.

Die 34 in Dänemark gezüchteten Stämme menschlicher Abkunft gehörten sämtlich dem Typ der Brucella abortus

an. Dafür sprachen die Ergebnisse mit den Farbstoffen aller 3 Fabrikate; die Empfindlichkeit gegenüber Thionin war bei einzelnen Stämmen etwas verschieden, hielt sich jedoch in den üblichen Grenzen. Wo untersucht, sprach auch das Verhalten auf Eiernährböden für die Zugehörigkeit zum Rindertyp, desgleichen das H_2S-Bildungsvermögen, das bei der Mehrzahl der Stämme deutlich vorhanden war; einige Stämme wiesen es jedoch in etwas geringerem Grade auf.

Ein dänischer Schweinestamm bildete in Uebereinstimmung mit den Angaben von Kristensen (1931) keinen Schwefelwasserstoff, zeigte sonst aber durchweg das Verhalten amerikanischer Schweinestämme.

Desgleichen zeigten sich 17 im hiesigen Institut aus Foeten, Nachgeburten, Hoden und Milch gezüchtete Stämme auf Grund aller Verfahren übereinstimmend als Angehörige des Brucella abortus-Typs. H_2S-Bildung und Thioninempfindlichkeit schwankten bei einigen Stämmen etwas.

Die 10 untersuchten Brucella melitensis-Stämme italienischer Herkunft sind von verschiedenen Seiten (Favilli, Kristensen) zur Verfügung gestellt worden; über ihre Abstammung von Mensch oder Tier war nichts bekannt. Thionin-Merck hemmte diese Stämme verhältnismäßig stark, im übrigen stimmten alle Verfahren eindeutig im Sinne von Brucella melitensis überein. Schwefelwasserstoffbildung fehlte oder war nur in ganz geringem Grade vorhanden. 2 Stämme zeigten in CO_2-Atmosphäre mäßige Hemmung.

Auch die vom Reichsgesundheitsamt zur Verfügung gestellten Brucella melitensis-Stämme zeigten übereinstimmend diesen Typ. Die aus Schwein und Mensch gezüchteten Brucella suis-Stämme hingegen konnten bei deutlicher Schwefelwasserstoffbildung und einwandfreiem Verhalten auf den Eiernährböden nur mit Hilfe des amerikanischen Pyronins eingruppiert werden. 3 vom Menschen gewonnene Abortusstämme besaßen durchweg den Charakter der Brucella abortus.

Ein schwedischer Brucella abortus-Stamm vom Menschen ensprach in seinem Verhalten ganz den dänischen Vertretern dieses Typs.

Von 3 schweizerischen Rinderstämmen, die sich auf Farb- und Eiernährböden wie Brucella abortus verhielten, wuchs einer nur in CO_2; ein anderer, als „alt" bezeichneter Stamm (Abortus I) erzeugte unter aeroben Bedingungen keinen, in CO_2 nur geringe Spuren von Schwefelwasserstoff. 4 bei Schweinen gezüchtete Stämme beanspruchten zu regelrechtem Farbverhalten das amerikanische Pyronin; die Kultur auf Eier-

nährböden und der H_2S-Nachweis vermochten sie richtig als Brucella suis einzugruppieren.

Die aus Ungarn bezogenen Brucella melitensis-Stämme (5) waren Vertreter ihres Typs; einer zeigte sich etwas CO_2-empfindlich. Desgleichen ließ auch ein Brucella abortus-Stamm keine Zweifel aufkommen, während ein anderer, mit „bikahere" bezeichneter, sich wohl hinsichtlich

Uebersicht III.

Typ	Herkunft (Land)	Abkunft	H_2S	Farbnährböden Thionin (amerik. Fabrik.)	Farbnährböden Pyronin (amerik. Fabrik.)	Eiernährböden ohne Malachitgrün	Eiernährböden mit Malachitgrün
Brucella abortus	Amerika	Mensch	+	—	+	—	—
	Dänemark	Mensch	+	—	+	—	—
	Institut	Rind	+	—	+	—	—
	R. G. A.	Mensch	+	—	+	—	—
	Schweden	Mensch	+	—	+	—	—
	Schweiz	Rind	-/+	—	+	—	—
	Ungarn	Rind?	+	—	+	—	—
Brucella suis	Amerika	Schwein	+	+	—	+	—
	„	Mensch	+	+	—	+	—
	Dänemark	Schwein	—	+	—	+	+
	R. G. A.	„	+	+	—	+	—
	„	Mensch	+	+	—	+	—
	Schweiz	Schwein	+	+	—	+	—
	Ungarn	„	±	+	—	+	—
	„	„	±	±	+	+	+
	„	„	+	±/+	+	—	—
Brucella melitensis	Italien	?	-	+	+	+	+
	R. G. A.	?	+	+	+	+	+
	Ungarn	?	—	+	+	+	+

seines Verhaltens auf Eiernährböden und seinem Schwefelwasserstoffbildungsvermögen nach als Brucella abortus-Stamm auswies, gegenüber Thionin aller 3 Fabrikate jedoch ziemlich widerstandsfähig war. Von den 7 im Anhang besonders aufgeführten Schweinestämmen ordneten sich 4 (Sertés II, IV, V und VII) trotz nahezu vollkommen fehlender H_2S-Bildung durch ihr Verhalten gegenüber dem amerikanischen Pyronin und auf den Eiernährböden in den Typ der Brucella suis ein. Sertés III, ein Stamm, der ebenfalls kein H_2S erzeugte, auf den malachitgrünhaltigen Eiernährböden etwas schwächer wuchs als auf denjenigen ohne Farbzusatz und von Thionin aller drei Fabrikate stark, von amerikanischem Pyronin teilweise gehemmt wurde, steht jedenfalls Brucella melitensis sehr nahe. Sertés I und VI waren gegen Thionin

durchweg empfindlicher als gegen Pyronin, wuchsen auf keinem der Eiernährböden und bildeten deutlich Schwefelwasserstoff. Ihren unzweifelhaften Brucella abortus-Charakter dürften sie vielleicht einem früheren Ursprung vom Rind verdanken.

Uebersicht III dient dem Vergleich der einzelnen Typen verschiedener geographischer Herkunft. Sowohl für die amerikanischen wie für die dänischen und schweizerischen Schweinestämme wird z. B. angenommen (Habs 1935), daß sie ohne Beziehung untereinander an Ort und Stelle entstanden sind. Es ist deshalb von einigem Wert, kennen zu lernen, ob sie sich in ihren biologischen Eigenschaften untereinander gleich verhalten oder ob wesentliche Unterschiede zwischen ihnen bestehen. Das gleiche gilt für die anderen Typen.

Die in der Schweiz, in Ungarn sowie hier im Institut vom Rind gezüchteten Abortus-Stämme gehören, trotz hin und wieder vorhandener kleiner Abweichungen im H_2S-Bildungsvermögen durchweg dem Typ der Brucella abortus an.

In Amerika, Dänemark, Deutschland und Schweden beim Menschen gezüchtete Abortus-Stämme verhalten sich sowohl auf den Farb- wie auf den Eiernährböden und hinsichtlich ihrer Schwefelwasserstoffbildung übereinstimmend mit den vom Rind gezüchteten Stämmen und gehören deshalb dem Typ der Brucella abortus an. Kleinere Abweichungen, namentlich hinsichtlich der Fähigkeit, H_2S zu bilden, sind keine ausgesprochenen geographischen Typenmerkmale, sondern Kennzeichen einzelner Stämme.

Die in Deutschland und der Schweiz gefundenen Schweinestämme tierischer und menschlicher Abkunft stimmen mit den amerikanischen überein. Die dänischen und zum Teil auch die ungarischen Stämme weichen nur durch ihre geringe bzw. fehlende H_2S-Erzeugung von ihnen ab. Drei der untersuchten ungarischen Stämme (Sertés I, III, VI) dürften in ihrem ersten Ursprung auf andere Tiere (Rind? Schaf?) zurückgehen.

Die menschlichen Stämme vom Schweinetyp aus Amerika und Deutschland (R.G.A.) besitzen alle Kennzeichen der amerikanischen Schweinestämme.

Brucella melitensis-Stämme italienischer und ungarischer Herkunft unterscheiden sich in ihrem kulturellen Verhalten nicht voneinander.

Mit diesen vergleichenden Gegenüberstellungen läßt sich über die Brauchbarkeit der 3 Verfahren zur Typenbestimmung folgendes Urteil fällen:

1. Das Verhalten auf Farbnährböden (Thionin, Pyronin) bietet große Zuverlässigkeit, sofern die von Huddleson

benutzten amerikanischen Farbstoffe benutzt werden. Die gleichzeitig geprüften deutschen Fabrikate erlauben zwar eine sichere Bestimmung der Brucella abortus, versagen aber in der Unterscheidung zwischen Brucella suis und Brucella melitensis.

2. Durch den Schwefelwasserstoffnachweis lassen sich Brucella abortus und Brucella suis auf der einen und Brucella melitensis auf der anderen Seite in vielen Fällen unterscheiden, doch kommen innerhalb der einzelnen Typen so zahlreiche Ausnahmen vor, daß die alleinige Anwendung dieses Verfahrens nicht zu befürworten ist. Dagegen ist es als wertvolle Ergänzung zu anderen Verfahren dringend zu empfehlen.

3. Die Kultur auf Eiernährböden mit und ohne Malachitgrünzusatz ist in ihren Ergebnissen dem Farbverfahren mindestens ebenbürtig; sie besitzt den Vorteil, daß sie unter Verwendung eines deutschen Farbfabrikates zum Ziele führt und die erforderlichen Nährböden nicht besonders angefertigt zu werden brauchen, weil sie für die Praxis der Tuberkelbakterienzüchtung ständig im Vorrat gehalten werden.

Bedeutung der Brucellatypen.

Nachdem im vorhergehenden die Frage der kulturellen Typenbestimmung nach ihrer technischen Seite hin abgehandelt worden ist, bleibt noch die allgemeine Frage zu prüfen, ob die der Unterscheidung zugrundegelegten Merkmale beständig sind und welche Bedeutung den Brucellatypen zukommt.

Stockmayer (1933) fand Rinderstämme nach einmaliger, Gilman, Milks und Birch (1934) nach 2 bis 6maliger Schweinepassage in jeder Hinsicht (Farbverhalten, Schwefelwasserstoffbildung, Meerschweinchenpathogenität) unverändert. Ebensowenig beeinflußten wiederholte Ziegenpassagen von Brucella abortus menschlichen und tierischen Ursprungs den früheren Typencharakter (Vercellana 1929, Weigmann 1931, Henricsson und Lindström 1936). Auch der längere Aufenthalt von Brucella melitensis im Rinderkörper brachte keine Annäherung an die Merkmale von Brucella abortus (Vercellana 1929, Taylor, Vidal und Roman 1934). Nur Herrmann, Korjukin und Spiridonow (1936) berichten, daß sie bei allen „Typen“ nach Meerschweinchen- und Mäusepassagen Aenderungen teils sogar grundsätzlicher Art sowohl im Hinblick auf das CO_2-Bedürfnis als auch auf das Schwefelwasserstoffbildungsvermögen und das Verhalten zu Anilinfarben beobachtet haben. Kristensen (1931) konnte indessen eine Beeinflussung durch Meerschweinchenpassagen nicht feststellen.

Neben dem Einfluß von Tierpassagen ist wichtig, ob die lange Haltung der Stämme auf künstlichen Nährböden die anfänglichen Kennzeichen so verändert, daß bei späteren Nachuntersuchungen grundsätzliche Abweichungen zum Vorschein kommen.

Um über diese Frage Aufschluß zu erhalten, wurde eine Reihe von Stämmen 6 bis 18 Monate nach der ersten Untersuchung einer erneuten Prüfung auf ihr Farbverhalten und H_2S-Bildungsvermögen unterzogen. In keinem Falle ließen sich hierbei zwischen den früher und später erhobenen Befunden mehr als gradmäßige Unterschiede erkennen, die im Hinblick auf die beigegebenen Kontrollen aber der jeweiligen Nährbodengüte zuzuschreiben waren.

Die seit der ersten Prüfung eingetretene Gewöhnung einzelner Brucella abortus-Stämme an aerobe Wachstumsbedingungen wirkte sich im Farbverhalten ebensowenig ändernd aus, wie die lange aerobe Weiterzüchtung; auch Grumbach und Grilicheß konnten trotz jahrelanger aerober Haltung ursprünglich CO_2-beanspruchender Stämme keine Beeinflussung des Farbverhaltens feststellen.

Ob die geringe bzw. fehlende Schwefelwasserstoffbildung bei dem einen schweizerischen sowie bei einem hier seit $8\frac{1}{2}$ Jahren auf künstlichen Nährmitteln gehaltenen Rinderstamm als Alterserscheinung anzusehen ist, war umso weniger zu entscheiden, als 3 bis 5 Jahre alte Stämme dieses Vermögen noch in hohem Maße zeigten, während andere es schon in 6 bis 18 Monaten teilweise verloren haben. Kristensen (1931) und Hofmann und Bartsch (1933) weisen auf den möglichen Einfluß des Alterns hin.

An einer Reihe von Stämmen konnten die erhobenen Befunde mit Ergebnissen, die von anderer Seite (Favilli 1931, Kristensen (und Cerruti) 1931, Zeller und Stockmayer 1932) über sie mitgeteilt worden sind, verglichen und ihre grundsätzliche Uebereinstimmung festgestellt werden.

So weist denn die Beständigkeit der für die einzelnen Typen gefundenen Unterscheidungsmerkmale sowohl bei wiederholten Tierpassagen als auch bei längerer Haltung auf künstlichen Nährmitteln darauf hin, daß man es nicht mit Zufälligkeiten, sondern mit ziemlich scharf umrissenen biologischen Eigentümlichkeiten zu tun hat, die es erlauben, innerhalb der Brucellagruppe von „Typen“ zu sprechen.

Nach den bisherigen Kenntnissen sind diese Typen als festgewordene Varietäten ursprünglich eines Organismus anzusehen, die ihren heutigen besonderen Charakter durch ihren Standort (Rind, Schwein, Ziege) und die sonstigen Umweltsbedingungen erhalten haben. Sie sind dabei in ihren Eigentümlichkeiten so fest geworden, daß auch ein langer Aufenthalt in einem anderen Wirtskörper sie nicht mehr zu ändern vermag.

Obwohl die biologische Typenunterscheidung keine Möglichkeit bietet, die unmittelbare Abkunft eines Stammes von

einem bestimmten Wirt (Rind, Schwein, Ziege, Mensch, Pferd usf.) zu erkennen, so erlaubt sie doch, ihn mit ziemlicher Sicherheit auf seine Urquelle zurückzuführen. Hierin, also im Hinweis auf die mittelbare oder unmittelbare Seuchenquelle, liegt auch, bei aller noch gebotenen Vorsicht, der praktische Wert der Typenbestimmung für die Bekämpfung.

Schlußsätze.

1. An 105 Brucellastämmen verschiedener Herkunft wurden 3 Verfahren zur kulturellen Typenbestimmung vergleichend geprüft: das *Verhalten auf Farbnährböden* (Thionin, Pyronin), das *Schwefelwasserstoffbildungsvermögen* und die *Kultur auf Eiernährböden.*

2. Das *Verhalten auf Thionin-Pyronin-Nährböden* bietet bei Verwendung amerikanischer Farbfabrikate große Zuverlässigkeit: Brucella abortus wird von Thionin stärker gehemmt als von Pyronin, Brucella suis verhält sich umgekehrt und Brucella melitensis verträgt bei mäßiger Hemmung beide Farbstoffe etwa gleich gut.

   Zwei gleichzeitig auf ihre Brauchbarkeit geprüfte deutsche Fabrikate von Thionin und Pyronin hatten nicht die gleichen typentrennenden Eigenschaften. Sie erlaubten eine sichere Bestimmung nur hinsichtlich Brucella abortus.

3. Das Schwefelwasserstoffbildungsvermögen reicht für sich allein zur Typenbestimmung nicht aus, da es tiefgreifende Unterschiede nur zwischen Brucella abortus und Brucella suis einerseits und Brucella melitensis andererseits nachzuweisen vermag und Abweichungen im Verhalten einzelner Stämme jeden Typs nicht selten sind.

   Der H_2S-Nachweis ist als Ergänzung zu anderen Verfahren wertvoll und zu empfehlen.

4. a) Die *Kultur auf Eiernährböden nach De Santis* bewies große Zuverlässigkeit für die Typenbestimmung. Brucella abortus wird auf Petragnani-Nährböden mit und ohne Malachitgrünzusatz völlig gehemmt, während Brucella melitensis ungehindert und üppig wächst. Brucella suis, die sich beim Fehlen von Malachitgrün üppig entwickelt, wird in dessen Gegenwart völlig gehemmt. Bei einzelnen Stämmen, aber meist nicht vor dem 9. oder 10. Tage eintretendes Spätwachstum ist als solches leicht zu erkennen und stört die Typenbestimmung nicht.

   b) Mit dem *Milch-Ei-Agar nach Bruschettini* konnten restlos befriedigende Ergebnisse bisher nicht erzielt werden.

5. Die Unterscheidungskultur auf Eiernährböden ist dem Farbverfahren mindestens ebenbürtig und hat den Vorzug, daß sie mit einem deutschen Farbstoff zum Ziele führt und die erforderlichen Nährböden, weil für die Tuberkelbakterienzüchtung ständig im Vorrat, nicht eigens angefertigt zu werden brauchen.
6. Wiederholte Prüfungen einzelner Stämme zeigten im Verlaufe von 6 bis 18 Monaten keine Abweichungen vom ursprünglichen Verhalten, sprachen also für die Beständigkeit der zur Typenbestimmung herangezogenen Merkmale.

Schrifttum.

1. *Aichelburg,* Di, Boll. Soc. intern. Micr. Sez. Ital. **7,** 1935, 17. — 2. *Beattie und Rice,* J. amer. med. Assoc. **102,** 1934, 1670. — 3. *Benussi, L.,* Ann. Igiene **45,** 1935, 28. — 4. *Bonanno,* Giorn. Batter. **10,** 1933, 296. — 5. *Brotzu,* Bull. Sci. med. Bologna **5,** 1927, 206. — 6. *Bruschettini, G.,* Boll. Sez. ital., Soc. intern. Micr. **6,** 1934, 35. — 7. *Bruschettini, G.,* daselbst **7,** 1935, 224. — 8. *Bruschettini, G.,* Rev. Microbiol., Paris **1,** 1935, 341. — 9. *Buck, I. M.,* J. agricult. Res. **29,** 1924, 585. — 10. *Cantani, A.,* Giorn. Batter. **12,** 1934, 322. — 11. *Cerutti, C. F.,* Boll. Istit. sieroter. milan. **11,** 1932, 400. — 12. *Confalone, R.,* Boll. Soc. intern. Micr. Sez. Ital. **4,** 1932, 533. — 13. *Confalone, R.,* Giorn. Med. milan. **81,** 1933, 633. — 14. *Costantino, S.,* Giorn. Batter. **13,** 1934, 158. — 15. *Cotton, W. E.,* J. amer. vet. med. Assoc. **83,** 1933, 91. — 16. *Duncan,* Trans. roy. Soc. trop. Med. **22,** 1928, 269. — 17. *Evans, A.,* J. inf. Dis. **22,** 1918, 580. — 18. *Evans, A.,* U. S. Publ. Health Rep. **38,** 1923, 1943 und 1949. — 19. *Famulari, S. und Pisa, G.,* Giorn. Batter. **10,** 1933, 274. — 20. *Favilli, G.,* Sperimentale **84,** 1930, 287. — 21. *Favilli, G.,* Zbl. Bakter. I. **Orig. 120,** 1931, 24. — 22. *Fernández Ithurrat, E. M.,* Rev. Assoc. méd. argent. **48,** 1934, 816. — 23. *Foresti, C.,* La Nuova Vet. **1934,** Nr. 3, 15. — 24. *Gilles, M., G. Pérès und Culty,* Rev. gén. Méd. vét. **41,** 1932, 476. — 25. *Gilman, H. L. und C. H. Milks,* Rep. New York State Vet. Coll. **1934,** 155. — 26. *Gilmann, Milks und Birch,* J. inf. Dis. **54,** 1934, 171. — 27. *Grumbach, A. und R. K. Grilicheß,* Zbl. Bakter. I. **Orig. 126,** 1932, 321. — 28. *Habs, H.,* Zbl. Bakter. I. **Orig. 116,** 1930, 89. — 29. *Habs, H.,* Zbl. ges. Hyg., **28,** 1932, 481; **30,** 1933, 369 **(Schriftenverzeichnis).** — 30. *Habs, H.,* Sonderdruck a. Verh. naturhist. med. Ver. Heidelbg. **1935,** 15 S. — 31. *Hardy, A. V., C. F. Jordan, J. H. Borts und G. H. Hardy,* Publ. Health Rep. **1930,** 2433. — 32. *Harms, A.,* J. of Bact. **9,** 1924, 273. — 33. *Harms, A.,* J. amer. vet. med. Assoc. **34,** 1934, 246. — 34. *Hayes, F. M.,* J. amer. vet. med. Assoc. **84,** 1934, 322. — 35. *Henricsson, E. und Bo Lindström,* Zbl. Bakter. I. **Orig. 136,** 1936, 449. — 36. *Herrmann, O., Korjukin, E. und N. Spiridonow,* Z. Immf. **87,** 1936, 372. — 37. *Hoeden, van der, J.,* Tijdschr. v. diergeneesk. **59,** 1932, 250. — 38. *Hofmann und Bartsch,* Zbl. Bakter. I. **Orig. 129,** 1933, 449. — 39. *Huddleson, Hasley und Torrey,* J. inf. Dis. **40,** 1927, 352. — 40. *Huddleson und Abell,* J. of. Bact. **1927;** J. inf. Dis. **42,** 1928, 242; **43,** 81. — 41. *Huddleson, J. F.,* J. Bact. **17,** 1929, 58. — 42. *Huddleson, J. F.,* Arch. Inst. Pasteur Tunis **19,** 1930, 391. — 43. *Huddleson, J. F.,* Amer. J. Publ. Health **21,** 1931, 491. — 44. *Jordan, C. F. und J. H. Borts,* Publ. Health Rep. **1931**/II, 2437. — 45. *Kien-Hun und Kan,* Zschr. Hyg. **117,** 1935, 399. — 46. *Kitselman,* Ch. H., J. amer. vet. med. Assoc. **80,** 1932, 828. — 47. *Klimmer, M.,* Weichardt Erg. Hyg. **XIII,** 1932, 327. — 48. *Kristensen, M. und Per Holm,* Zbl. Bakter. I. **Orig. 112,** 1929, 281. — 49. *Kristensen, M.,* Zbl. Bakter I. **Orig. 120,** 1931, 179. — 50. *Liddo, S.,* Boll. Sez. ital. Soz. internaz. Microb. **5,** 1933, 317. — 51. *Lignières, J.,* Bull. Acad. Méd. Paris III s., **107,** 1932, 910. — 52. *Lipatoff, L.,* Z. Mikrobiol. **14,** 1935, 573. — 53. *Lübke, A.,* D. T. W. **41,** 1933, 646. — 54. *Magallon,* Bull. Acad. Vét. de France **VII,** 1934, 48. — 55. *Makkaveiskij, V., und J. Karkadinovskaja,* Z. Mikrobiol. **9,** 1932, 97. — 56. *Mallardo, C. A.,* J. trop. Med. **33,** 1930, 125. — 57. *Mallmann, W. L. und F. Gallo,* J. agrigult. Res. **46,** 1933, 267. — 58. *Manninger,* B. T. W. **50,** 1934, 252 (Wechselrede Paris, Int. Tiers.). — 59. *Marchi, G.,* Clin. Vet. **57,** 1934, 972. — 60. *Margani, G.,* Giorn. Batter. **14,** 1935, 1112. — 61. *Marshall, M. S. und D. Jared,* J. inf. Dis. **49,** 1931, 318. — 62. *McAlpine und Slanetz,* J. inf. Dis., **42,** 1928, 66, 73; **43,** 232. — 63. *Menzani, C.,* La Nuova Vet. **1934,** Nr. 2, 31. — 64. *Meyer und Shaw,* J. inf. Dis. **27,** 1920, 173. — 65. *Meyer, K. F.,* J. Labor a. clin. Med. **15,** 1930, 437. — 66. *Meyer und Eddie,* J. Labor a. clin. Med. **15,** 1930, 447. — 67. *Meyer, K. F. und*

C. E. Zobell, J. inf. Dis. **51,** 1932, 72. — 68. *Mießner und Köser,* D. T. W. **41,** 1933, 308. — 69. *Mino, Di,* Boll. Istit. sieroter. milan. **14,** 1935, 123. — 70. *Morales-Otero,* Porto Rico J. publ. Health **1929,** 144; **1930,** 3. — 71. *Olin, G. und B. Lindström,* Zbl. Bakter. I. **Orig. 131,** 1934, 257. — 72. *Olitzki und Bromberg,* Zbl. Bakter. I. **Orig. 120,** 1931, 347. — 73. *Orlow, A. und Orlowa, S.,* Arch. biol. Nauk. **35,** 1934, Lfg. 2. — 74. *Pagnini,* Giorn. Batter. **XI,** 1933. — 75. *Pagnini,* Boll. Istit. sieroter. milan. **13,** 1934, 145. — 76. *Pagnini,* Nuovo Ercolani **39,** 1934, 181. — 77. *Pagnini,* Giorn. Batter. **15,** 1935, 847. — 78. *Paltrinieri,* La Nuova Vet. **IX,** 1931, 357 und 395. — 79. *Paltrinieri,* La Nuova Vet. **XI,** 1933, 85. — 80. *Paltrinieri und Paltrinieri, G.,* La Nuova Vet. **XI,** 1933, 409. — 81. *Parisot, J., L. Vidal und Robert-Lévy,* C. r. Soc. Biol. Paris **110,** 1932, 78. — 82. *Plastridge und McAlpine,* J. inf. Dis. **46,** 1930, 315. — 83. *Plastridge und McAlpine,* J. inf. Dis. **47,** 1930, 478. — 84. *Pugnani,* Giron. Batter. **8,** 1932, 231. — 85. *Santis, De, M.,* Boll. Istit. sieroter. milan. **12,** 1933, 846. — 86. *Santis, De, M.,* Boll. Istit. sieroter. milan. **14,** 1935, 113. — 87. *Serra,* Nuovo Ercolani **39,** 1934, 397. — 88. *Smith, Th.,* J. of exp. Med. **43,** 1926, 317. — 89. *Smith, Th.,* Vet. Med. **28,** 1933, 98. — 90. *Subotnik, A. und D. Ustupnyi,* Z. Mikrobiol. **8,** 1931, 62. — 91. *Schwarzmaier, E., Z.* Infkr. Hst. **49,** 1936, 309. — 92. *Stockmayer, W.,* B. T. W. **49,** 1933, 741. — 93. *Taylor, R. M. und R. H. Hazemann,* Rev. d'Hyg. **54,** 1932, 481. — 94. *Taylor, R. M., M. Lisbonne und G. Roman,* Ann. Inst. Pasteur **49,** 1932, 284. — 95. *Taylor, R. M., Lisbonne und Vidal,* Presse méd. **1934,** 1882. — 96. *Taylor, Vidal und Roman,* C. r. Soc. Biol. **116,** 1934, 132. — 97. *Thomsen, A.,* Zbl. Bakter. I. **Orig. 130,** 1933, 257; J. inf. Dis. **54,** 1934, 345. — 98. *Tosatti, E.,* Pathologica Genov. **26,** 1934, 247. — 99. *Vercellana, G.,* Boll. Soc. intern. Micr. Sez. ital. **1,** 1929, 175. — 100. *Vignoli, L. und E. Schafer,* Arch. Méd. Gén. et Colon. **2,** 1933, 257. — 101. *Vittone, R.,* Boll. Sez. ital. intern. Microbiol. **7,** 1935, 277. — 102. *Vittone, R.,* Boll. Istit. sieroter. milan. **14,** 1935, 431. — 103. *Weigmann, F.,* Zbl. Bakter. I. **Orig. 121,** 1931, 318. — 104. *Werschilowa, P.,* Arch. Biol. Nauk. **35,** 1934, 513. — 105. *Wicht, v.,* Zbl. Bakter. I. **Orig. 131,** 1934, 54. — 106. *Wilson, G. S.,* Brit. J. exp. Path. **12,** 1931, 152. — 107. *Wilson, G. S.,* Bull. Hyg. **6,** 1931, 389. — 108. *Wilson, G. S.,* J. of Hyg. **33,** 1933, 516. — 109. *Witte, J.,* Z. Infkr. Hst. **48,** 1935, 14. — 110. *Zeller, H.,* B. T. W. **1920,** 345. — 111. *Zeller, H.,* B. T. W. **47,** 1931, 565. — 112. *Zeller, H. und W. Stockmayer,* Z. Infkr. Hst. **44,** 1932, 67. — 113. *Zeller, H.,* M. T. W, **84,** 1933, 337, 349, 361, 373; Off. Intern. des Epizooties, **R. 39,** 1933. — 114. *Zobell und Meyer,* Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. **28,** 1930, 160; **29,** 1931, 116. — 115. *Zobell und Meyer,* J. inf. Dis **51,** 1932, 91. — 116. *Zobell, C. E. und K. F. Meyer,* J. inf. Dis. **51,** 1932, 109. — 117. *Zwick, W. und H. Zeller,* Arb. Kais. Gesundheitsamt **43,** 1913, 1.

Lebenslauf.

Am 23. 10. 1906 als Sohn des damaligen Postkassiers und heutigen Postdirektors i. R. Karl Friedrich Schwarzmaier und dessen Ehefrau Julie geb. Schneider in Calw (Württ.) geboren, besuchte ich, Eberhard Schwarzmaier, 1913 bis 1915 die Volks- bzw. Elementarschule in Calw und Stuttgart und 1915 bis 1925 das Dillmann-Realgymnasium in Stuttgart, das ich am 14. 3. 1925 mit dem Reifezeugnis verließ.

Nach zweisemestrigem Studium der Volkswirtschaft und allgemeinen Wissenschaften an der Technischen Hochschule zu Stuttgart begann ich im Sommer-Semester 1926 an der Universität München das Studium der Veterinärmedizin, setzte es im 6. Semester in Hannover, im 7. in München und im 8. in Gießen fort, wo ich es mit dem 9. Semester abschloß. Die naturwissenschaftliche Prüfung habe ich im Wintersemester 1927/28 in München, die Fachprüfung im Wintersemester 1930/31 in Gießen bestanden.

Seit 15. 4. 1931 bin ich — mit 4 Monaten Unterbrechung im Winter 1932/33 (Praktikant und Aushilfstierarzt am Städtischen Vieh- und Schlachthof Stuttgart) — als wissenschaftlicher Hilfsarbeiter und seit 16. 7. 1934 als wissenschaftlicher Assistent am Veterinärhygienischen- und Tierseuchen-Institut der Universität Gießen tätig.